



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) EP 1 006 192 A2

(12) EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(21) Anmeldenummer: 99122650.7

(22) Anmeldetag: 13.11.1999

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/60, C12N 15/54,
C12N 15/77, C12P 13/02
// C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

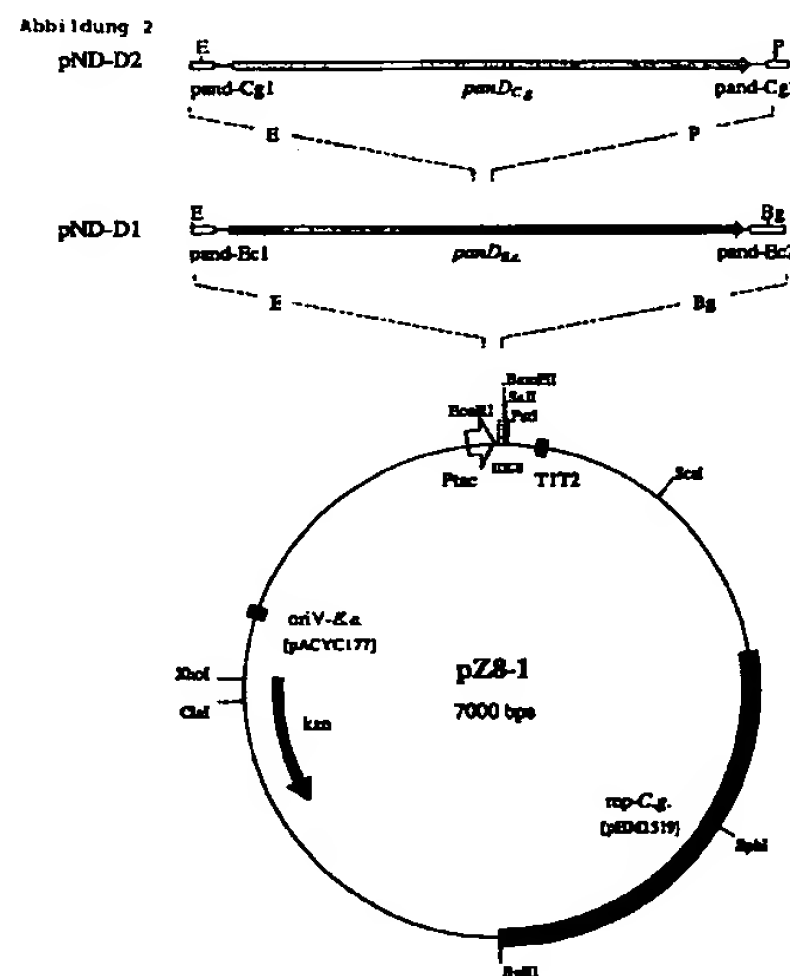
(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855313

(71) Anmelder:
Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:
• Dusch, Nicole, Dr.
33619 Bielefeld (DE)
• Kallnowski, Jörn, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
• Pühler, Alfred, Prof. Dr.
33739 Bielefeld (DE)

(54) Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure durch Verstärkung des panD-Gens in Mikroorganismen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure durch Fermentation von Mikroorganismen, in denen zumindest das panD-Gen verstärkt (überexprimiert) wird, gegebenenfalls in Kombination mit dem panB- und/oder panC-Gen, und Anreicherung der Pantothensäure im Medium oder den Zellen der Mikroorganismen.



EP 1 006 192 A2

Beschreibung**Stand der Technik**

5 [0001] Die Pantothersäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.

[0002] Pantothersäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährlösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Zwischenstufe. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, Isobutylaldehyd und Cyanid
10 hergestellt. In weiteren Verfahrensschritten wird das racemische Gemisch aufgetrennt und D-Pantolacton mit β -Alanin kondensiert und man erhält D-Pantothersäure.

[0003] Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten stereoisomeren D-Form die frei von L-Pantothersäure ist.

[0004] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. Escherichia coli, Arthrobacter ureafaciens, Corynebacterium erythrogenes, Brevibacterium ammoniagenes und auch Hefen, wie z. B. Debaryomyces castellii können wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothersäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei Escherichia coli durch Amplifikation von Pantothersäure-Biosynthesegenen aus E.coli, die auf den Plasmiden pFV3 und pFV5 enthalten sind, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, die Bildung von D-Pantothersäure verbessert wird.
15

[0005] EP-A 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 beschreiben von Escherichia coli Stamm IFO3547 abgeleitete Mutanten wie FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 und FV5069 die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite wie Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure, O-Methylthreonin und α -Ketoisovaleriansäure tragen und in einer Nährlösung, die Glucose enthält Pantoinsäure und in einer Nährlösung, die Glucose und β -Alanin enthält, D-Pantothersäure produzieren. In EPA 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 wird weiterhin gezeigt, daß
20 nach Amplifikation der Pantothersäure-Biosynthesegene, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, in den oben genannten Stämmen in einer Nährlösung die Glucose enthält die Produktion von D-Pantoinsäure und in einer Nährlösung die Glucose und β -Alanin enthält die Produktion von D-Pantothersäure verbessert wird.

[0006] In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß in Pantothersäure bildenden Stämmen von Escherichia coli durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II, einem Enzym der Valin Biosynthese, die
25 Pantothersäure-Produktion weiter gesteigert werden kann.

Aufgabe der Erfindung

[0007] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen
35 Herstellung von Pantothersäure bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

[0008] Das Vitamin Pantothersäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran neue Verfahren zur Herstellung von Pantothersäure bereitzustellen.
40

[0009] Wenn im Folgenden D-Pantothersäure oder Pantothersäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht nur die freien Säuren, sondern auch die Salze der D-Pantothersäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.

[0010] Gegenstand der Erfindung ist unter anderem ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothersäure unter Verwendung von Mikroorganismen, die insbesondere bereits D-Pantothersäure produzieren, und in denen das für die L-Aspartat-1-Decarboxylase (E.C. 4.1.1.11) kodierende panD-Gen einzeln oder in Kombination mit den Genen panB und/oder panC verstärkt, insbesondere überexprimiert wird. Die Erfindung betrifft weiter entsprechende rekombinante DNA-Sequenzen, wie sie in den Ansprüchen niedergelegt sind. Gegenstand der Erfindung sind ebenso
50 Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothersäure, die unter Verwendung der gemäß den Ansprüchen 8 bis 17 hergestellten, verbesserten, D-Pantothersäure erzeugenden Mikroorganismen durchgeführt werden.

[0011] Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.
55

[0012] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantothersäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen.

Es kann sich um Pilze oder Hefen oder Gram-positive Bakterien z. B. der Gattung *Corynebacterium* oder um Gram-negative Bakterien wie z. B. die der Enterobacteriaceae handeln. Bei der Familie der Enterobacteriaceae ist besonders die Gattung *Escherichia* mit der Art *Escherichia coli* zu nennen. Innerhalb der Art *Escherichia coli* sind die sogenannten K-12 Stämme wie z. B. die Stämme MG1655 oder W3110 (Neidhard et al.: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D.C.)) oder der *Escherichia coli* Wildtypstamm IFO3547 (Institut für Fermentation, Osaka, Japan) und davon abgeleitete Mutanten zu nennen. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist Aminosäuren zu produzieren. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 und davon abgeleitete Mutanten.

[0013] Die Erfinder fanden heraus, daß Mikroorganismen nach Überexpression des neuen für die L-Aspartat-1-Decarboxylase (E.C. 4.1.1.11) kodierenden panD-Gens, insbesondere aus *Corynebacterium glutamicum* in verbesserter Weise Pantothenensäure produzieren.

[0014] Die Erfinder haben darüberhinaus herausgefunden, daß die Überexpression des panD-Gens sich in Stämmen vorteilhaft auswirkt, in denen zusätzlich die für Ketopantoathydroxymethyltransferase und Pantothenatsynthetase kodierenden Gene panB und panC einzeln oder gemeinsam überexprimiert vorliegen.

[0015] Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen D-Pantothenatbildung zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

[0016] Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) oder im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). Darüberhinaus findet der Fachmann unter anderem Anleitungen bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134:1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13:347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40:183-190 (1985)), bei de Broer et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America 80:21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11, 187-193 (1993)), in PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26:222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80:161-169 (1989)), bei Hamilton (Journal of Bacteriology 171:4617-4622 (1989)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0017] Zur Isolierung des panD-Gens oder anderer Gene wie z.B. der Gene panB und panC von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E.coli* K-12 Stamm NM554

(Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Viera et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde.

Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et.al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) eingebaut. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp z.B. eine Auxotrophie hervorruft. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die *E. coli* Mutante DV9 (Vallari und Rock, Journal of Bacteriology 1985, 164:136-142), die eine Mutation im panD-Gen trägt von

besonderem Interesse. Ein anderes Beispiel für eine Pantothenensäure-bedürftige E. coli Mutante ist der Stamm SJ2, der eine Mutation im panB-Gen trägt und vom Genetic Stock Center der Yale University (New Haven, Connecticut, USA) bezogen werden kann. Nach Transformation des Indikatorstammes wie z.B. der panD-Mutante DV9 mit einem rekombinanten Plasmid, welches das interessierende Gen wie z.B. das panD-Gen trägt und Expression des betreffenden Gens, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden Eigenschaft wie z.B. der Pantothenensäure-Bedürftigkeit prototroph. Das dergestalt isolierte Gen bzw. DNA-Fragment kann durch Bestimmung der Sequenz, wie z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben, charakterisiert werden. Anschließend kann der Grad an Identität zu bekannten Genen, die in Datenbanken wie z.B. der GenBank (Benson et al., 1998, Nucleic Acids Research, 26:1-7) enthalten sind, mit publizierten Methoden (Altshul et al., 1990, Journal of Molecular Biology 215:403-410) analysiert werden.

[0018] Auf diese Weise wurde die neue für das Gen panD kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurden aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Enzyme abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des panD-Genproduktes nämlich der L-Aspartat-1-Decarboxylase dargestellt. Weiterhin wurde auf diese Weise die neue für die Gene panB und panC kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID NO 3 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. In SEQ ID NO 4 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des panB-Genproduktes nämlich der ketopantoathydroxymethyltransferase dargestellt und in SEQ ID NO 5 die sich ergebende Aminosäuresequenz des panC-Genproduktes nämlich der Pantothenatsynthetase dargestellt.

[0019] Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 3 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 3 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 und/oder SEQ ID NO 5 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

[0020] Das auf diese Weise charakterisierte Gen kann anschließend einzeln oder in Kombination mit anderen in einem geeigneten Mikroorganismus zur Expression gebracht werden. Eine bekannte Methode Gene zu exprimieren bzw. überzuexprimieren besteht darin diese mit Hilfe von Plasmidvektoren zu amplifizieren, die überdies mit Expressionssignalen ausgestattet sein können. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für Escherichia coli kommen z.B. die Vektoren pSC101 (Vocke and Bastia, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80 (21), 6557-6561 (1983)) oder pKK223-3 (Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81, 6929 (1984)), für Corynebacterium glutamicum z.B. der Vektor pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) für die vorliegende Erfindung in Frage. Beispiele für derartige Mikroorganismen sind die C. glutamicum-Stämme ATCC13032/pND-D2 und ATCC13032/pND-DBC2 und der E. coli-Stamm MG1655/pND-D2, die die Plasmide pND-D2 und pND-DBC2 enthalten. Plasmid pND-D2 ist ein auf dem Plasmid pZ8-1 basierender E. coli-C. glutamicum Pendelvektor der das panD-Gen von C. glutamicum trägt. Plasmid pND-DBC2 ist ein auf dem Plasmid pZ8-1 basierender E. coli-C. glutamicum Pendelvektor der die Gene panD, panB und panC von C. glutamicum trägt.

[0021] Es ist dem Fachmann klar, daß chromosomale Mutationen, die Resistenz gegen Metabolite und Antimetabolite bewirken oder die das Abfließen von Vorstufen der Pantothenensäure verhindern, in vorteilhafter Weise mit den Massnahmen die Gegenstand der Erfindung sind kombiniert werden können.

[0022] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantothenensäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0023] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren

wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantothenensäure-Produktion Vorstufen der Pantothenensäure wie Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoinsäure oder Pantoinsäure und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0024] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasgemischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 50°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothenensäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0025] Stämme, die eine hohe Aktivität des Enzyms L-Aspartat 1-Decarboxylase besitzen, können auch für die Herstellung von β -Alanin aus L-Aspartat eingesetzt werden: Hierzu können fermentative Verfahren, enzymatische Umwandlungsreaktionen oder Kombinationen beider eingesetzt werden.

[0026] Die Konzentration an gebildeter Pantothenensäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden.

[0027] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

Corynebacterium glutamicum ATCC13032/pND-D2 als DSM12438

Corynebacterium glutamicum ATCC13032/pND-DBC2 als DSM12437

Beispiele

[0028] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Klonierung und Sequenzierung des panD-Gens von C. glutamicum

1. Klonierung des panD-Gens

[0029] Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid, 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit der Restriktionsenzym Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sau3A, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 7-9 kb wurden mit Hilfe des "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland; Cat. No. 740584) isoliert und in die dephosphorylierte BamHI-Schnittstelle des Vektors pUC19 (Norlander et al., 1982, Gene, 26:101-106), der von der Firma MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) bezogen wurde, ligiert. Die Ligation wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37°C konnte die C. glutamicum Genbank durch Reisolierung der Plasmid-DNA nach der "Alkalischen-Lyse-Methode" von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Research, 7: 1513-1523, 1977) aus den Transformanten gewonnen werden. Mit dieser Genbank wurden kompetente Zellen des E. coli Stamms DV9 (Vallari und Rock, 1985, Journal of Bacteriology, 164:136-142), welcher eine Mutation im panD-Gen trägt, elektroporiert. Der Elektroporationsansatz wurde im Anschluß

an die Regenerationsphase (Tauch et.al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) zweimal mit Medium E (Vogel and Bonner, 1956, Journal of Biological Chemistry, 218:97-106) gewaschen. Die Zusammensetzung des Mediums E ist in Tabelle 1 dargestellt. Mit diesen Zellen wurden 50 ml Medium E + 100 µg/ml Ampicillin, die in einem 250 ml Erlenmeyerkolben vorlagen, inokuliert und in einem Luftschüttler bei 250 U/min und 39°C inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurde die Bakteriensuspension verdünnt und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) ausgestrichen, der mit 100 µg/ml Ampicillin supplementiert worden war.

Tabelle 1

| Substanz | Menge pro Liter | Bemerkung |
|---|-----------------|-----------------------|
| K ₂ HPO ₄ | 10 g | |
| NaNH ₄ HPO ₄ * 4 H ₂ O | 3,5 g | |
| Zitronensäure | 2 g | |
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 0,2 g | |
| Glukose | 4 g | separat sterilisieren |
| Thiamin | 0,2 µg | sterilfiltrieren |

[0030] Die Plasmid-DNA einer DV9-Transformante wurde isoliert, als pNIC-1.3 bezeichnet und mittels Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour-Laboratory Press) und Vergleich mit Standard-DNA-Fragmenten bekannter Länge charakterisiert. Plasmid pNIC-1.3 enthält eine Insertion von 7 kbp Länge. Die Komplementationsfähigkeit von pNIC-1.3 wurde durch erneute Transformation der panD Mutante DV9 überprüft. Die erhaltenen Transformanten waren wiederum fähig, in β-Alanin-freiem Medium E unter den oben angegebenen Bedingungen zu wachsen.

[0031] Die Subklonierung des 7 kb Inserts erfolgte durch Spaltung des Plasmids pNIC-1.3 mit den Restriktionsenzymen BamHI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-03), EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung EcoRI, Code no. 27-0884-03) und BglII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BglII, Code no. 27-0946-02) und anschließender Ligation in den entsprechend restriktionsverdauten Vektor pK18mob (Schäfer, 1994, Gene, 145:69-73). Der erhaltene Ligationsansatz wurde in die E. coli panD Mutante DV9 elektroporiert; die Selektion auf komplementierte Transformanten erfolgte wie oben beschrieben wobei die Agarplatten in diesem Fall 50 µg/ml Kanamycin enthielten. Die Plasmide von komplementierten Einzelklonen wurden isoliert und mittels Restriktionsanalysen charakterisiert. Ein EcoRI-Subklon, im Folgenden pNIC-10 genannt, mit einem ungefähr 3 kb großen DNA-Insert wurde für die folgende Sequenzanalyse ausgewählt.

2. Sequenzierung des panD-Gens

[0032] Für die doppelsträngige Sequenzierung des 3 kb Fragments von pNIC-10 wurde dieses mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und die Fragmente in die Plasmide pUC19 oder pK18mob subkloniert. Die zum Sequenzieren eingesetzte Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben mit dem "QIAGEN Plasmid Mini kit" (Qiagen, Inc., Chatsworth, Ca., USA) isoliert und die Bestimmung der Plasmidgrößen mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

[0033] Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (Proceedings of the National Academies of Sciences USA, 74:5453-5467, 1977) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (Nucleic Acids Research, 18:1067, 1990). Es wurde der "Cy5-AutoRead Sequencing kit" von Pharmacia (Product No. 27-2690-02, Freiburg, Germany) angewandt. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierungsreaktion erfolgte in einem "Long Ranger Gel Solution"-Polyacrylamidgel (FMC BioProducts, Rockland, Me., USA) mit dem "automatischen Laser-Fluoreszenz (A.L.F.) Express DNA Sequenziergerät" von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (Nucleic Acids Research, 14:217-231, 1986) Version 97-0 prozessiert. Sämtliche Einzelsequenzen der pNIC-10 Subklone wurden zu einem zusammenhängenden 3060 bp langen Contig assembliert, der als Contig13 bezeichnet wurde.

Die computergestützte Kodierbereichsanalyse mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) des gesamten DNA-Fragments ergab die Identifizierung von fünf offenen Leseraster (ORFs). In Abbildung 1 ist ein Restriktionskarte von Contig13 sowie die Lage der als orf- bis orf-5 bezeichneten ORFs dargestellt. Homologieanalysen wurden mit den "BLAST search programs" (Gish and States, 1993, Nature of Genetics,

3:266-272; Altschul et al., 1990, Journal of Molecular Biology, 215:403-410), welche über den Online-Service des NCBI-Servers der "National Library of Medicine" (Bethesda, MD, USA) zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Die Analyse von Contig13 ergab, daß orf-3 das panD-Gen ist. Im Folgenden wird orf-3 als panD bezeichnet. Die Nukleotidsequenz des das panD-Gen tragenden DNA-Fragmentes ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Aminosäuresequenz des sich mit obigen Methoden ergebenden panD-Genproduktes nämlich der L-Aspartat 1-Decarboxylase ist als SEQ ID NO 2 wiedergegeben.

Beispiel 2

10 Klonierung und Sequenzierung der Gene panB und panC aus *C. glutamicum*

1. Klonierung der Gene panB und panC

[0034] Chromosomale DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert und mit der Restriktionsendonuklease Sau3A geschnitten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 3 bis 7 kb bzw. von 9 bis 20 kb extrahiert und nachfolgend in die singuläre BamHI Schnittstelle des Vektors pBR322 ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mc^r (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 87 (1990) 4645-4649) transformiert (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166 (1983) 557-580). Inserttragende Kolonien wurden anhand ihrer Tetracyclinsensitivität nach Überimpfen auf 10 μ g/ml Tetracyclin enthaltende LB-Agarplatten identifiziert. Durch Plasmidpräparationen (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) von vereinigten Klonen wurden 8 Gruppen, welche je 400 Plasmide mit einer Insertgröße von 9 bis 20 kb und 9 Gruppen, welche je 500 Plasmide mit einer Insertgröße von 3 bis 7 kb, enthielten isoliert. Die *E. coli* panB Mutante SJ2 (Cronan et al. 1982, Journal of Bacteriology 149: 916-922) wurde mit dieser Genbank mittels Elektroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356) transformiert. Die Transformationsansätze wurden direkt auf CGXII-Medium mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) ausplattiert. Von Klonen, welche in der Lage waren ohne Pantothenatsupplementation zu wachsen, wurde Plasmid-DNA isoliert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Bei 8 Plasmiden konnte durch Retransformation die Fähigkeit, den panB-Defekt der *E. coli* Mutante SJ2 heterolog zu komplementieren, bestätigt werden.

[0035] Mit diesen 8 Plasmiden wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt. Einer der untersuchten Plasmidvektoren, im Folgendem pUR1 genannt enthielt ein Insert von 9,3 kb (Abbildung 2). Die Transformation der *E. coli* panC Mutante DV39 (Vallari und Rock 1985, Journal of Bacteriology 164: 136-142) ergab, daß der Vektor pUR1 ebenfalls in der Lage war den panC Defekt dieser Mutante zu komplementieren.

2. Sequenzierung des panB- und des panC-Gens

[0036] Ein 2,2 kb großes Fragment des Inserts (Abbildung 2) von pUR1 wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. sequenziert (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden zunächst mittels Exonuklease III Subklone erzeugt, die mit Hilfe von Standard Primern (Universal und reverse primer der Firma Boehringer Mannheim, Deutschland) sequenziert wurden. Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzierungsansätze erfolgte mit dem automatischem Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 3 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserastern. Ein offenes Leseraster von 813 bp Länge, das als panB-Gen identifiziert wurde, kodiert für ein Polypeptid von 271 Aminosäuren und ist als SEQ ID NO 4 wiedergegeben. Das zweite offene Leseraster, das als panC-Gen identifiziert wurde, umfaßt 837 Basenpaare. Es kodiert für ein Polypeptid von 279 Aminosäuren, das als SEQ ID NO 5 wiedergegeben ist.

50 Beispiel 3

Konstruktion von Vektoren zur Expression von panD, panBC und panDBC

[0037] Die Pantothenatbiosynthese-Gene aus *C. glutamicum* und *E. coli* wurden unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonucleotiden amplifiziert. Die PCR-Experimente wurden mit der Tag DNA polymerase der Firma Gibco-BRL (Eggestein, Deutschland) in einem "PCT-100 Thermocycler" (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA) durchgeführt. Auf einen einmaligen Denaturierungsschritt von 2 Minuten bei 94°C folgte ein Denaturierungsschritt von 90 Sekunden bei 94°C, ein Annealingschritt für 90 Sekunden bei einer Primerabhängi-

gen Temperatur von $T=(2AT+4GC) -5^{\circ}\text{C}$ (Suggs, et al., 1981, S. 683-693, In: D. D. Brown, and C. F. Fox (Eds.), Developmental biology using purified genes. Academic Press, New York, USA) sowie ein 90 Sekunden dauernder Extensionsschritt bei 72°C . Die letzten drei Schritte wurden 35 mal zyklisch wiederholt und die Reaktion wurde mit einem finalen Extensionsschritt von 10 Minuten bei 72°C beendet. Die so amplifizierten Produkte wurden, nachdem sie im Agarosegel elektrophoretisch geprüft worden sind, den Herstellerangaben zufolge in den Vektor pCR[®]2.1 (Original TA Cloning Kit, Invitrogene (Leek, Niederlande), Produktbeschreibung Original TA Cloning[®] Kit, Cat. no. KNM2030-01.) ligiert und anschließend in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert. Die Selektion auf Transformanten erfolgte durch Inkubation bei 37°C für 24 Stunden auf LB-Agarplatten mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 40 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid).

[0038] Ausgehend von den Nucleotidsequenzen der Pantothenatbiosynthese-Gene panD (SEQ ID NO 1) und panBC (SEQ ID NO 3) von C. glutamicum ATCC 13032 und von E. coli K12 (W.K. Merkel and B.P. Nichols, 1993, Gen-Bank: L17086) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Diese Primer wurden so ausgewählt, daß die amplifizierten Fragmente die Gene sowie deren native Ribosomen-Bindestellen, nicht aber mögliche Promotor-Regionen enthalten. Zusätzlich wurden geeignete Restriktionsschnittstellen eingefügt, die das Klonieren in den Zielvektor ermöglichen. Die Sequenzen der PCR-Primer, die eingefügten Schnittstellen (Sequenz unterstrichen) sowie das amplifizierte Gen (Fragmentgröße in bp ist in Klammern angegeben) sind in der folgenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2

| Primer | Sequenz mit Restriktionsschnittstelle | Produkt | Plasmid |
|----------|---|---------------------------------------|---------|
| panD-Ec1 | 5' - <u>GAATTC</u> GACAGGGTAGAAAGGTAGA-3' EcoRI | panD _{E.c.} (462 bp) | pND-D1 |
| panD-Ec2 | 5' - <u>AGATCT</u> GGGATAACAATCAAGCAACC-3' BglII | | |
| panD-Cg1 | 5' -CATCTCACGCTAT <u>GAATTCT</u> -3' EcoRI | panD _{C.g.} (405 bp) | pND-D2 |
| panD-Cg2 | 5' -ACGAGGCCTGCAGCAATA-3' PstI | | |
| panBC-E1 | 5' - <u>GGATCC</u> CACAACATCAATTTATCAGG-3' BamHI | panBC _{E.c.} (1700 bp) | pND-BC1 |
| panBC-E2 | 5' - <u>GGATCCT</u> TAAGTATTACGCCAGCTC-3' BamHI | | |
| panBC-C1 | 5' - <u>GTCGACTCT</u> GAGCTGGTCATCACATC-3' SalI | panBC _{C.g.} (1700 bp) | pND-BC2 |
| panBC-C2 | 5' - <u>GTCGACACG</u> CAGGGTTGGTACTAGAG-3' SalI | | |

[0039] Als Basisvektor zur Expression sowohl in *C. glutamicum* als auch in *E. coli* wurde der in Abbildung 3 dargestellte *E. coli*-*C. glutamicum*-Shuttle-Expressionsvektor pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) eingesetzt. Die zuvor in den Vektor pCR[®]2.1 klonierten Amplifikate wurden mittels der Primer-inserierten Restriktionsschnittstellen in den ebenso behandelten Expressionsvektor pZ8-1 ligiert und somit unter die Kontrolle des auf diesem Plasmid enthaltenen *tac*-Promotors gebracht. Einzige Ausnahme stellt das Amplifikat panD_{E.c.} dar, hier wurde das EcoRI-BglII-Fragment in die kompatiblen EcoRI-BamHI-Restriktionssenden des Vektors pZ8-1 kloniert. Die jeweiligen Plasmidbezeichnungen für die so konstruierten Expressionsplasmide sind in der Tabelle 2 angegeben. Der Expressionsvektor pZ8-1 mit dem Gen panD_{E.c.} von *E. coli* wird pND-D1 und pZ8-1 mit dem Gen panD_{C.g.} von *C. glutamicum* wird pND-D2 genannt. Entsprechend werden die Expressionsplasmide, die PanBC_{E.c.} und panBC_{C.g.} enthalten als pHD-BC1 bzw. pND-BC2 bezeichnet. Beispielhaft ist in der Abbildung 3 die Klonierungsstrategie für die Gene panD_{E.c.} und panD_{C.g.} in den Vektor pZ8-1 dargestellt. Die korrekte Klonierung aller Expressionsplasmide wurde durch Sequenzierung der jeweiligen Inserts überprüft.

[0040] Weiterhin wurden sowohl mit den *E. coli* als auch mit den *C. glutamicum* panD-Genen ein künstliches panDBC-Operon konstruiert. Für das *E. coli* Operon wurde der panD_{E.c.} enthaltende Vektor pCR2.1 mit EcoRI gespalten, die DNA im Agarosegel aufgetrennt und das panD-Fragment wurde, wie schon in Beispiel 1.1 beschrieben, mittels "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) aus dem Gel aufgereinigt. Anschließend wurde das Fragment in das EcoRI gespaltene Plasmid pND-BC1 ligiert. Plasmide mit einer korrekten Orientierung des panD-Gens wurden dadurch erhalten, daß das Ligationsgemisch in den panD auxotrophen *E. coli* Stamm DV9 transformiert und dieser wie in Beispiel 1 beschrieben auf Komplementation der Auxotrophie hin selektiert wurde. Plasmid-DNA der komplementierten Mutanten wurde isoliert und die korrekte Genanordnung wurde durch Ansequenzierung des Inserts des pND-DBC1 genannten Plasmids bestätigt (Abbildung 4).

[0041] Für die Konstruktion des *C. glutamicum* panDBC-Operons wurde ähnlich verfahren. Der panD_{C.g.} enthaltene Vektor pCR2.1 wurde EcoRI gespalten, wodurch das panD_{C.g.}-Gen zum einen über die Primer-interne und zum anderen über eine EcoRI-Schnittstelle des Vektors aus diesem herausgespalten wurde. Dieses Gen-Fragment wurde nach Aufreinigung in den EcoRI-gespaltenen Vektor pZ8-1 kloniert und Plasmide mit der korrekten panD-Orientierung, pND-D4 genannt, wurden wie oben beschrieben erhalten und überprüft. Anschließend wurde das Plasmid pND-D4 mit dem Restriktionsenzym Sall gespalten und mit dem aufgereinigten panBC-Fragment, welches durch Sall-Verdau (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sall Code no. 27-0882-01) des Plasmids pND-BC2 erhalten wurde, ligiert. Das Elektroporationsgemisch wurde in den *E. coli* Stamm DH5 α MCR elektroporiert und die 10 Plasmide mit der Genanordnung panDBC wurden durch Restriktionsanalysen ermittelt. Die korrekte Genanordnung eines dieser Plasmide, das als pND-DBC2 (Abbildung 4) bezeichnet wurde, wurde durch Sequenzanalyse verifiziert.

[0042] Der Expressionsvektor pZ8-1 sowie die auf diesem Plasmid beruhenden Konstrukte pND-D1, pND-D2 und pND-DBC1 wurden in den *E. coli* Stamm MG1655 transformiert und Transformanten auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 50 μ g/ml Kanamycin selektiert. Die erhaltenen Stämme wurden MG1655/pZ8-1, MG1655/pND-D1, MG1655/pND-D2 und MG1655/pND-DBC1 genannt.

[0043] Durch Elektroporation der Plasmide pZ8-1, pND-D1, pND-D2 und pND-DBC2 in den *C. glutamicum* Stamm ATCC13032 und anschließender Selektion auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 25 μ g/ml Kanamycin wurden die Stämme ATCC13032/pZ8-1, ATCC13032/pND-D1, ATCC13032/pND-D2 und ATCC13032/pND-DBC2 erhalten.

Beispiel 4

Bildung von Pantothanat durch verschiedene *E. coli* K12 Stämme

[0044] Die quantitative Bestimmung von D-Pantothanat erfolgte mittels des *Lactobacillus plantarum* Pantothanat-Assays (Teststamm: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, Cat. No.3211-30-3; Kulturmedium: Bacto Pantothenate Assay Medium (DIFCO Laboratories, Michigan, USA), Cat. No. 0604-15-3) Dieser Indikatorstamm kann nur bei Anwesenheit von Pantothanat im angegebenen Kulturmedium wachsen und zeigt eine photometrisch meßbare, lineare Abhängigkeit des Wachstums von der Pantothanat-Konzentration des Mediums. Für die Kalibrierung wurde das Hemicalciumsalz von Pantothanat eingesetzt (Sigma, Produktbezeichnung P 2250). Die optische Dichte wurde an einem LKB Biochrom Photometer der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 580 nm (o.D.₅₈₀) bestimmt.

[0045] Für die Pantothanat-Produktion der *E. coli* Stämme MG1655/pZ8-1, MG1655/pND-D1, MG1655/pND-D2 und MG1655/pND-DBC1 wurden 50 ml Testmedium (Medium E mit 50 μ g/ml Kanamycin) aus einer 16 Stunden alten Kultur des gleichen Mediums mit einer o.D.₅₈₀ von 0,1 angeimpft. Nach 5 und 72stündiger Inkubation dieser Kulturen bei 37°C und 250 (U/min wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 x g pelletiert. Der erhaltene zellfreie Überstand wurde steriltfiltriert und bis zur Pantothanat-Quantifizierung bei 4°C gelagert.

[0046] Die Quantifizierung des D-Pantothanats im Kulturüberstand erfolgte mittels *L. plantarum* ATCC 8014 nach

Angaben des Handbuchs der Firma DIFCO (DIFCO MANUAL, 10th Edition, S. 1100-1102; Michigan, USA). Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

| Stamm | Gen | oD ₅₈₀ und Pantothenat-Akkumulation (µg/ml) | | | |
|-----------------|------------------------|--|------|-------------------|------|
| | | 5 Std. | | 72 Std. | |
| | | oD ₅₈₀ | Pan. | oD ₅₈₀ | Pan. |
| MG1655/pZ8-1 | - | 2,0 | 0,30 | 2,3 | 1,47 |
| MG1655/pND-D1 | panD _{E.c.} | 2,3 | 0,90 | 2,5 | 6,95 |
| MG1655/pND-DBC1 | PanDBC _{E.c.} | 2,0 | 0,96 | 2,0 | 6,96 |
| MG1655/pND-D2 | panD _{C.g.} | 2,2 | 4,07 | 2,3 | 9,66 |

Beispiel 5

Bildung von Pantothenat durch verschiedene Stämme von C. glutamicum

[0047] Die Bildung von Pantothenat durch die C. glutamicum Stämme ATCC13032/pZ8-1, ATCC13032/pND-D1, ATCC13032/pND-D2 und C. glutamicum ATCC13032/pND-DBC2 wurden in Medium CGXII (Keilhauer et al., 1993, Journal of Bacteriology, 175:5595-5603; Tabelle 4), das mit 25 µg/ml Kanamycin supplementiert wurde, geprüft. Dieses Medium wird im Folgenden als C. glutamicum-Testmedium bezeichnet. Je 50 ml C. glutamicum-Testmedium wurden aus einer 16 Stunden alten Kultur des gleichen Mediums mit einer o.D.₅₈₀ von 0,1 angeimpft. Nach 48stündiger Inkubation bei 30°C und 150 U/min wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 x g entfernt, der Überstand sterilfiltriert und die Pantothenat-Konzentration wie in Beispiel 4 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse der Pantothenat-Produktion durch die verschiedenen Stämme von C. glutamicum sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 4

| Substanz | Menge pro Liter | Bemerkung |
|---|-----------------|-----------------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₂ | 20 g | |
| Harnstoff | 5 g | |
| KH ₂ PO ₄ | 1 g | |
| K ₂ HPO ₄ 1 g | | |
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O 0.25 g | | |
| MOPS | 42 g | |
| CaCl ₂ | 10 mg | |
| FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 10 mg | |
| MnSO ₄ * H ₂ O | 10 mg | |
| ZnSO ₄ * 7 H ₂ O | 1 mg | |
| CuSO ₄ | 0.2 mg | |
| NiCl ₂ * 6 H ₂ O | 0.02 mg | |
| Biotin | 0.5 mg | |
| Glukose | 40 g | separat autoklavieren |
| Protocatechusaure | 0.03 mg | sterilfiltrieren |

Tabelle 5

5

10

| Stamm | Gen | Pantothenat (µg/ml) | |
|--------------------|------------------------|---------------------|------|
| | | oD ₅₈₀ | Pan. |
| ATCC13032/pZ8-1 | - | 21 | 0,19 |
| ATCC13032/pND-D1 | PanD _{E.c.} | 20 | 0,32 |
| ATCC13032/pND-D2 | panD _{C.g.} | 19 | 1,78 |
| ATCC13032/pND-DBC2 | panDBC _{C.g.} | 20 | 2,60 |

15 Abbildungen

[0048] Folgende Abbildungen sind beigefügt:

- Abbildung 1: Karte des Contig13 mit orf-1-orf-5
- 20 • Abbildung 2: Karte des in pUR1 enthaltenen, klonierten DNA-Fragmentes und Lageangabe des sequenzierten DNA-Abschnittes
- Abbildung 3: Karte der Plasmide pZ8-1, pND-D1 und pND-D2
- Abbildung 4: Karte der Plasmide pND-DBC1 und pND-DBC2

25 [0049] Die in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

- rrnBT1T2: Transkriptions-Terminator des rrnB-Gens
- Ptac: tac Promotor
- 30 panB: Kodierbereich des panB Gens
- panC: Kodierbereich des panC Gens
- 35 panD: Kodierbereich des panD Gens
- rep-C.g.: DNA-Region für Replikation in C. glutamicum
- oriV-E.c.: Ursprung für vegetativen Transfer in E. coli
- 40 kan: Resistenzgen für Kanamycin
- EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI
- 45 E: Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI
- BamHI: Schnittstelle des Restriktionsenzym BamHI
- B Schnittstelle des Restriktionsenzym BamHI
- 50 BglII: Schnittstelle des Restriktionsenzym BglII
- Clal: Schnittstelle des Restriktionsenzym Clal
- 55 H: Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII
- NcoI: Schnittstelle des Restriktionsenzym NcoI

EP 1 006 192 A2

| | | |
|----|-------|--|
| | Nrul: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys Nrul |
| | Nsil: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys Nsil |
| 5 | P: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys PstI |
| | PstI: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys PstI |
| | PvuI: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys PvuI |
| 10 | SacI: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys SacI |
| | Sall: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys Sall |
| 15 | Scal: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys Scal |
| | SphI: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys SphI |
| | X: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys XbaI |
| 20 | XhoI: | Schnittstelle des Restriktionsenzymys XhoI |

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

10

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Weissfrauenstr. 9
- (C) ORT: Frankfurt am Main
- (D) BUNDESLAND: Hessen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-60311

15

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure durch Verstärkung des panD-Gens in Mikroorganismen

20

- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

25

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version

#1.30 (EPA)

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

35

- (A) LAENGE: 540 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

40

- (iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRUENGLICHE HERKUNFT:

45

- (A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
- (B) STAMM: ATCC13032

(ix) MERKMAL:

50

- (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
- (B) LAGE: 77..484
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 77

55

EP 1 006 192 A2

/EC_number= 4.1.1.11
/product= "L-Aspartat-1-decarboxylase"
/gene= "panD"

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | | |
|----|---|-----|
| | AATATTCCTT TCCTTGTCAT CTCACGCTAT GATTTCTAAA ACTTGCAGGA CAACCCCCAT | 60 |
| 10 | AAGGACACCA CAGGAC ATG CTG CGC ACC ATC CTC GGA AGT AAG ATT CAC Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His 1 5 10 | 109 |
| 15 | CGA GCC ACT GTC ACT CAA GCT GAT CTA GAT TAT GTT GGC TCT GTA ACC Arg Ala Thr Val Thr Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr 15 20 25 | 157 |
| | ATC GAC GCC GAC CTG GTT CAC GCC GCC GGA TTG ATC GAA GGC GAA AAA Ile Asp Ala Asp Leu Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys 30 35 40 | 205 |
| 20 | GTT GCC ATC GTA GAC ATC ACC AAC GGC GCT CGT CTG GAA ACT TAT GTC Val Ala Ile Val Asp Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val 45 50 55 | 253 |
| | ATT GTG GGC GAC GCC GGA ACG GGC AAT ATT TGC ATC AAT GGT GCC GCT Ile Val Gly Asp Ala Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala 60 65 70 75 | 301 |
| 25 | GCA CAC CTT ATT AAT CCT GGC GAT CTT GTG ATC ATC ATG AGC TAC CTT Ala His Leu Ile Asn Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu 80 85 90 | 349 |
| 30 | CAG GCA ACT GAT GCG GAA GCC AAG GCG TAT GAG CCA AAG ATT GTG CAC Gln Ala Thr Asp Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His 95 100 105 | 397 |
| | GTG GAC GCC GAC AAC CGC ATC GTT GCG CTC GGC AAC GAT CTT GCG GAA Val Asp Ala Asp Asn Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu 110 115 120 | 445 |
| 35 | GCA CTA CCT GGA TCC GGG CTT TTG ACG TCG AGA AGC ATT TAGCGTTTTA Ala Leu Pro Gly Ser Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile 125 130 135 | 494 |
| | GCTCGCCAAT ATTGCTGCCG GCCTCGTTGA AAATGGTCAT GGTGGC | 540 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

40

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LAENGE: 136 Aminosaeuren
(B) ART: Aminosaeure
(D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

| | |
|----|--|
| | Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His Arg Ala Thr Val Thr 1 5 10 15 |
| 50 | Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr Ile Asp Ala Asp Leu 20 25 30 |
| | Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys Val Ala Ile Val Asp 35 40 45 |

55

Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val Ile Val Gly Asp Ala
50 55 60
5 Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala His Leu Ile Asn
65 70 75 80
Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu Gln Ala Thr Asp Ala
85 90 95
10 Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His Val Asp Ala Asp Asn
100 105 110
Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu Ala Leu Pro Gly Ser
115 120 125
15 Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile
130 135

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LAENGE: 2164 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
20 (C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
25 (iv) ANTISENSE: NEIN
(vi) URSPRUENGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
(B) STAMM: ATCC13032
30 (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
(B) LAGE: 351..1163
(D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 351
/EC_number= 4.1.2.12
/product= "Ketopantoathydroxymethyltransferase"
/gene= "panB"
35 (ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS
(B) LAGE: 1166..2002
(D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 1166
/EC_number= 6.3.2.1
/product= "Pantothenatsynthetase"
40 /gene= "panC"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCTTCGGGGT ACCAATTCCT TTAAGAACCA TCAGATCAAT CTGTTGTACA TTCTCGGCCA 60
45 GATTCAGCTT TTCGGTAAGG ACGAAACACT TTCACTTGAA TCGGCAGCAA AGTTTCTTAA 120
AGTTTCTAAG GCAACTGCAA CGAGGTATTT TAGAACTCTC CGAGAAATGG AATTAGTTCA 180
CGAGGTCAGC AAACGCCCTT TCGGGTTTGC GCTCACGGAT AAAGGTCGTG AGATAGTAGG 240
50 TCTTGAGGTA AAAATTTGAC TCCATAACGA GAACTTAATC GAGCAACACC CCTGAACAGT 300
GAATCAAATC GGAATTTATT TATTCTGAGC TGGTCATCAC ATCTATACTC ATG CCC 356
Met Pro

55

EP 1 006 192 A2

| | | |
|----|---|------|
| 5 | ATG TCA GGC ATT GAT GCA AAG AAA ATC CGC ACC CGT CAT TTC CGC GAA Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe Arg Glu 140 145 150 | 404 |
| | GCT AAA GTA AAC GGC CAG AAA GTT TCG GTT CTC ACC AGC TAT GAT GCG Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asp Ala 155 160 165 170 | 452 |
| 10 | CTT TCG GCG CGC ATT TTT GAT GAG GCT GGC GTC GAT ATG CTC CTT GTT Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu Leu Val 175 180 185 | 500 |
| 15 | GGT GAT TCC GCT GCC AAC GTT GTG CTG GGT CGC GAT ACC ACC TTG TCG Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr Leu Ser 190 195 200 | 548 |
| | ATC ACC TTG GAT GAG ATG ATT GTG CTG GCC AAG GCG GTG ACG ATC GCT Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr Ile Ala 205 210 215 | 596 |
| 20 | ACG AAG CGT GCG CTT GTG GTG GTT GAT CTG CCG TTT GGT ACC TAT GAG Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr Tyr Glu 220 225 230 | 644 |
| 25 | GTG AGC CCA AAT CAG GCG GTG GAG TCC GCG ATC CGG GTC ATG CGT GAA Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met Arg Glu 235 240 245 250 | 692 |
| | ACG GGT GCG GCT GCG GTG AAG ATC GAG GGT GGC GTG GAG ATC GCG CAG Thr Gly Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile Ala Gln 255 260 265 | 740 |
| 30 | ACG ATT CGA CGC ATT GTT GAT GCT GGA ATT CCG GTT GTC GGC CAC ATC Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly His Ile 270 275 280 | 788 |
| | GGG TAC ACC CCG CAG TCC GAG CAT TCC TTG GGC GGC CAC GTG GTT CAG Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val Val Gln 285 290 295 | 836 |
| 35 | GGT CGT GGC GCG AGT TCT GGA AAG CTC ATC GCC GAT GCC CGC GCG TTG Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg Ala Leu 300 305 310 | 884 |
| 40 | GAG CAG GCG GGT GCG TTT GCG GTT GTG TTG GAG ATG GTT CCA GCA GAG Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro Ala Glu 315 320 325 330 | 932 |
| | GCA GCG CGC GAG GTT ACC GAG GAT CTT TCC ATC ACC ACT ATC GGA ATC Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile Gly Ile 335 340 345 | 980 |
| 45 | GGT GCC GGC AAT GGC ACA GAT GGG CAG GTT TTG GTG TGG CAG GAT GCC Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln Asp Ala 350 355 360 | 1028 |
| 50 | TTC GGC CTC AAC CGC GGC AAG AAG CCA CGC TTC GTC CGC GAG TAC GCC Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu Tyr Ala 365 370 375 | 1076 |
| | ACC TTG GGC GAT TCC TTG CAC GAC GCC GCG CAG GCC TAC ATC GCC GAT Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile Ala Asp 380 385 390 | 1124 |

55

EP 1 006 192 A2

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | ATC | CAC | GCG | GGT | ACC | TTC | CCA | GGC | GAA | GCG | GAG | TCC | TTT | TA | ATG | CAG | 1171 |
| | Ile | His | Ala | Gly | Thr | Phe | Pro | Gly | Glu | Ala | Glu | Ser | Phe | | Met | Gln | |
| | 395 | | | | | 400 | | | | | 405 | | | | 1 | | |
| 5 | GTA | GCA | ACC | ACA | AAG | CAG | GCG | CTT | ATC | GAC | GCC | CTC | CTC | CAC | CAC | AAA | 1219 |
| | Val | Ala | Thr | Thr | Lys | Gln | Ala | Leu | Ile | Asp | Ala | Leu | Leu | His | His | Lys | |
| | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | | |
| | TCC | GTC | GGG | CTC | GTC | CCC | ACC | ATG | GGT | GCG | CTA | CAC | AGC | GGA | CAC | GCC | 1267 |
| 10 | Ser | Val | Gly | Leu | Val | Pro | Thr | Met | Gly | Ala | Leu | His | Ser | Gly | His | Ala | |
| | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | | |
| | TCG | TTG | GTT | AAA | GCA | GCA | CGC | GCT | GAA | AAC | GAC | ACT | GTT | GTA | GCC | AGT | 1315 |
| | Ser | Leu | Val | Lys | Ala | Ala | Arg | Ala | Glu | Asn | Asp | Thr | Val | Val | Ala | Ser | |
| | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | | 50 | |
| 15 | ATT | TTT | GTC | AAT | CCC | CTG | CAG | TTT | GAA | GCA | CTC | GGT | GAT | TGC | GAT | GAT | 1363 |
| | Ile | Phe | Val | Asn | Pro | Leu | Gln | Phe | Glu | Ala | Leu | Gly | Asp | Cys | Asp | Asp | |
| | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | | 65 | | |
| | TAC | CGC | AAC | TAT | CCC | CGC | CAA | CTC | GAC | GCC | GAT | TTA | GCA | CTG | CTT | GAA | 1411 |
| | Tyr | Arg | Asn | Tyr | Pro | Arg | Gln | Leu | Asp | Ala | Asp | Leu | Ala | Leu | Leu | Glu | |
| | | | 70 | | | | | | 75 | | | | | 80 | | | |
| 20 | GAG | GCA | GGT | GTG | GAT | ATT | GTG | TTC | GCA | CCC | GAT | GTG | GAG | GAA | ATG | TAC | 1459 |
| | Glu | Ala | Gly | Val | Asp | Ile | Val | Phe | Ala | Pro | Asp | Val | Glu | Glu | Met | Tyr | |
| | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | |
| | CCC | GGT | GGC | TTG | CCA | CTA | GTG | TGG | GCG | CGC | ACC | GGT | TCC | ATC | GGA | ACA | 1507 |
| 25 | Pro | Gly | Gly | Leu | Pro | Leu | Val | Trp | Ala | Arg | Thr | Gly | Ser | Ile | Gly | Thr | |
| | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | |
| | AAA | TTG | GAG | GGT | GCC | AGC | AGG | CCT | GGC | CAT | TTC | GAT | GGT | GTG | GCT | ACC | 1555 |
| | Lys | Leu | Glu | Gly | Ala | Ser | Arg | Pro | Gly | His | Phe | Asp | Gly | Val | Ala | Thr | |
| | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | 130 | |
| 30 | GTG | GTG | GCG | AAG | CTG | TTC | AAT | TTG | GTG | CGC | CCT | GAT | CGT | GCA | TAT | TTT | 1603 |
| | Val | Val | Ala | Lys | Leu | Phe | Asn | Leu | Val | Arg | Pro | Asp | Arg | Ala | Tyr | Phe | |
| | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | 145 | | |
| | GGA | CAA | AAA | GAT | GCT | CAG | CAG | GTT | GCG | GTG | ATT | CGG | CGA | TTG | GTT | GCC | 1651 |
| | Gly | Gln | Lys | Asp | Ala | Gln | Gln | Val | Ala | Val | Ile | Arg | Arg | Leu | Val | Ala | |
| | | | | 150 | | | | 155 | | | | | | 160 | | | |
| 35 | GAT | CTA | GAC | ATT | CCC | GTG | GAG | ATT | CGT | CCC | GTT | CCG | ATT | ATT | CGT | GGC | 1699 |
| | Asp | Leu | Asp | Ile | Pro | Val | Glu | Ile | Arg | Pro | Val | Pro | Ile | Ile | Arg | Gly | |
| | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | |
| | GCC | GAT | GGC | TTA | GCC | GAA | TCC | AGC | CGC | AAT | CAA | CGT | CTT | TCT | GCG | GAT | 1747 |
| 40 | Ala | Asp | Gly | Leu | Ala | Glu | Ser | Ser | Arg | Asn | Gln | Arg | Leu | Ser | Ala | Asp | |
| | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | |
| | CAG | CGA | GCG | CAA | GCT | CTG | GTG | CTG | CCG | CAG | GTG | TTG | AGT | GGG | TTG | CAG | 1795 |
| | Gln | Arg | Ala | Gln | Ala | Leu | Val | Leu | Pro | Gln | Val | Leu | Ser | Gly | Leu | Gln | |
| | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | 210 | |
| 45 | CGT | CGA | AAA | GCA | GCT | GGT | GAA | GCG | CTA | GAT | ATC | CAA | GGT | GCG | CGC | GAC | 1843 |
| | Arg | Arg | Lys | Ala | Ala | Gly | Glu | Ala | Leu | Asp | Ile | Gln | Gly | Ala | Arg | Asp | |
| | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | 225 | | |
| | ACC | TTG | GCC | AGC | GCC | GAC | GGC | GTG | CGC | TTG | GAT | CAC | CTG | GAA | ATT | GTC | 1891 |
| | Thr | Leu | Ala | Ser | Ala | Asp | Gly | Val | Arg | Leu | Asp | His | Leu | Glu | Ile | Val | |
| | | | | 230 | | | | 235 | | | | | | 240 | | | |
| 50 | GAT | CCA | GCC | ACC | CTC | GAA | CCA | TTA | GAA | ATC | GAC | GGC | CTG | CTC | ACC | CAA | 1939 |
| | Asp | Pro | Ala | Thr | Leu | Glu | Pro | Leu | Glu | Ile | Asp | Gly | Leu | Leu | Thr | Gln | |
| | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | |

55

EP 1 006 192 A2

CCA GCG TTG GTG GTC GGC GCG ATT TTC GTG GGG CCG GTG CGG TTG ATC 1987
 Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg Leu Ile
 260 265 270

5 GAC AAT ATC GAG CTC TAGTACCAAC CCTGCGTTGC AGCAGCGAGC TTCGCATAAC 2042
 Asp Asn Ile Glu Leu
 275

GCGTGCTCAG CTCAGTGTTT TTAGGTGCGC GGTGCGGATC GGAACCGGGA GTTGCCCACT 2102

10 GCGGTGGCGT GGCCTCACCC GACAGCGCCC ATGCCGCCTG ACGAGCTGCA CCCAACGCCA 2162

CA 2164

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LAENGE: 271 Aminosaeuren
 (B) ART: Aminosaeure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Pro Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe
 1 5 10 15

Arg Glu Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

25 Asp Ala Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu
 35 40 45

Leu Val Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr
 50 55 60

30 Leu Ser Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr
 65 70 75 80

Ile Ala Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr
 85 90 95

35 Tyr Glu Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met
 100 105 110

Arg Glu Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile
 115 120 125

40 Ala Gln Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly
 130 135 140

His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val
 145 150 155 160

45 Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg
 165 170 175

Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro
 180 185 190

Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile
 195 200 205

50 Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln
 210 215 220

55

EP 1 006 192 A2

Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu
 225 230 235 240
 5 Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile
 245 250 255
 Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe
 260 265 270
 10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LAENGE: 279 Aminosaeuren
 (B) ART: Aminosaeure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 15 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:
 Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His
 1 5 10 15
 20 His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly
 20 25 30
 His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val
 35 40 45
 25 Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys
 50 55 60
 Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu
 65 70 75 80
 30 Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu
 85 90 95
 Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile
 100 105 110
 35 Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val
 115 120 125
 Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala
 130 135 140
 40 Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu
 145 150 155 160
 Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile
 165 170 175
 45 Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser
 180 185 190
 Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly
 195 200 205
 50 Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala
 210 215 220
 Arg Asp Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu
 225 230 235 240

55

Ile Val Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu
245 250 255
5 Thr Gln Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg
260 265 270
Leu Ile Asp Asn Ile Glu Leu
275

10

Patentansprüche

- 15 1. In Mikroorganismen der Gattungen Corynebacterium und Escherichia replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA, die eine für Aspartat-1-decarboxylase codierende Nucleotidsequenz enthält.
2. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 1,
deren Nucleotidsequenz für panD mit der Herkunft aus einem Corynebacterium codiert, deren Lage in Abb. 1 wie-
20 dergegeben wird.
3. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2,
mit:
 - 25 (i) der Nucleotidsequenz, gezeigt in SEQ.-ID.-Nr. 1, die für panD codiert, oder
 - (ii) einer Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes ent-
spricht; oder
 - 30 (iii) einer Sequenz, die mit einer zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebe-
nenfalls
 - (iiii) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).
- 35 4. Mikroorganismen, insbesondere der Gattungen Corynebacterium oder Escherichia, transformiert durch die Einfüh-
rung der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Plasmidvektor pND-D2,
gekennzeichnet durch die in der Abbildung 2 wiedergegebenen Restriktionskarte, hinterlegt als Corynebacterium
40 glutamicum ATCC 13032/pND-D2 unter der Bezeichnung DSM 12438.
6. Plasmidvektor pND-DBC2,
gekennzeichnet durch die in der Abbildung 4 wiedergegebenen Restriktionskarte hinterlegt als Corynebacterium
45 glutamicum ATCC 13032/pND-DBC2 unter der Bezeichnung DSM12437.
7. Verfahren zur Herstellung von D-Pantothensäure, indem man das panD-Gen und gegebenenfalls weitere für die
Aspartat-1-decarboxylase codierende Nucleotidsequenzen in Mikroorganismen verstärkt (überexprimiert) und
diese Mikroorganismen zur Fermentation einsetzt.
- 50 8. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Verstärkung die Kopienzahl der Gene bzw. Nucleotidsequenzen durch Transformation
von Mikroorganismen mit diese Gene bzw. Nucleotidsequenzen tragenden Plasmidvektoren oder durch chromo-
somale Amplifikation erhöht.
- 55 9. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Überexpression die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und

Regulationsregion mutiert.

10. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
 5 daß man zur Erzielung der Überexpression stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.
11. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
 10 daß man die Expression des panD-Gens in den Mikroorganismen durch Verlängerung der Lebensdauer der entsprechenden m-RNA und/oder Verhinderung des Abbaus des zugehörigen Enzymproteins verbessert.
12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
 15 daß man das panD-Gen in Mikroorganismen überexprimiert, die weitere Metabolit- bzw. Antimetabolit-Resistenzmutationen aufweisen.
13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
 20 daß man die Mikroorganismen zu Erzielung der Überexpression in geänderten Kulturmedien fermentiert und/oder die Fermentationsführung ändert.
14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 13,
dadurch gekennzeichnet,
 25 daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Pantothenat-(Pantothensäure)-bildung verringern.
15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 8 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,
 30 daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich zum panD-Gen die übrigen Gene des Stoffwechselweges der Pantothensäurebildung, einzeln oder gemeinsam verstärkt (überexprimiert).
16. Verfahren gemäß Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
 35 daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man eines oder mehrere der Gene, die für die Enzyme Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (EC 4.1.2.12), und Pantothenat-Synthetase (EC 6.3.2.1) kodieren, zusätzlich zum panD-Gen, insbesondere mit der Herkunft Corynebacterium verstärkt (überexprimiert)
17. Verfahren gemäß den Ansprüchen 15 und 16,
dadurch gekennzeichnet,
 40 daß man mit verschiedenen kompatiblen, die genannten Gene einzeln enthaltenden Plasmidvektoren transformierte Mikroorganismen einsetzt.
18. Verfahren gemäß den Ansprüchen 15 und 16,
dadurch gekennzeichnet,
 45 daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt und der Plasmidvektor eines oder mehrere der genannten Gene einschließlich des panD-Gens trägt, in dem die Gene nacheinander angeordnet und unter die Kontrolle eines gemeinsamen Promotors oder getrennt voneinander angeordnet unter die Kontrolle verschiedener Promotoren gestellt werden.
- 50 19. Verfahren gemäß Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
 daß man mit dem Plasmidvektor pND-D2 transformierte Mikroorganismen einsetzt.
20. Verfahren gemäß Anspruch 17,
 55 **dadurch gekennzeichnet,**
 daß man mit dem Plasmidvektor pND-DBC2 transformierte Mikroorganismen einsetzt.
21. Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure,

dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation von Mikroorganismen gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
in denen zumindest das panD-Gen verstärkt (überexprimiert) wird, gegebenenfalls in Kombination mit dem
panB-und/oder panC-Gen,
b) Anreicherung der Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
c) Isolieren der Pantothensäure.
- 10 22. Verfahren gemäß Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß die überexprimierten Gene aus Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium stammen.
- 15 23. Verfahren gemäß den Ansprüchen 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß man in Stufe a) eine Vorstufe der Pantothensäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe Aspartat, β -Alanin,
Ketoisovalerat, Ketopantoat oder Pantoat.
- 20 24. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen der Gattungen Escherichia oder Corynebacterium einsetzt.

25

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1

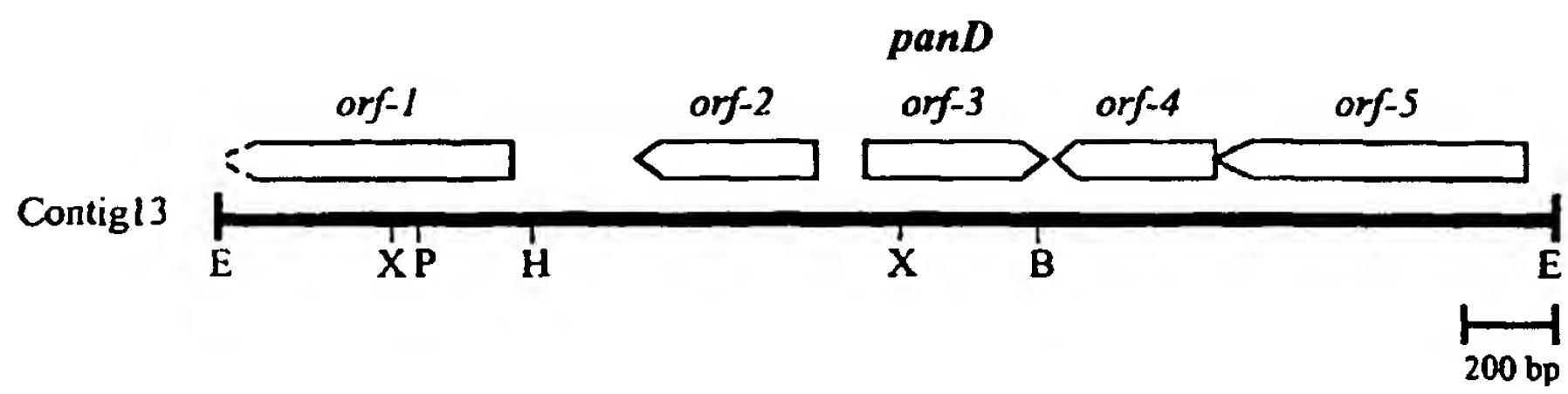


Abbildung 2

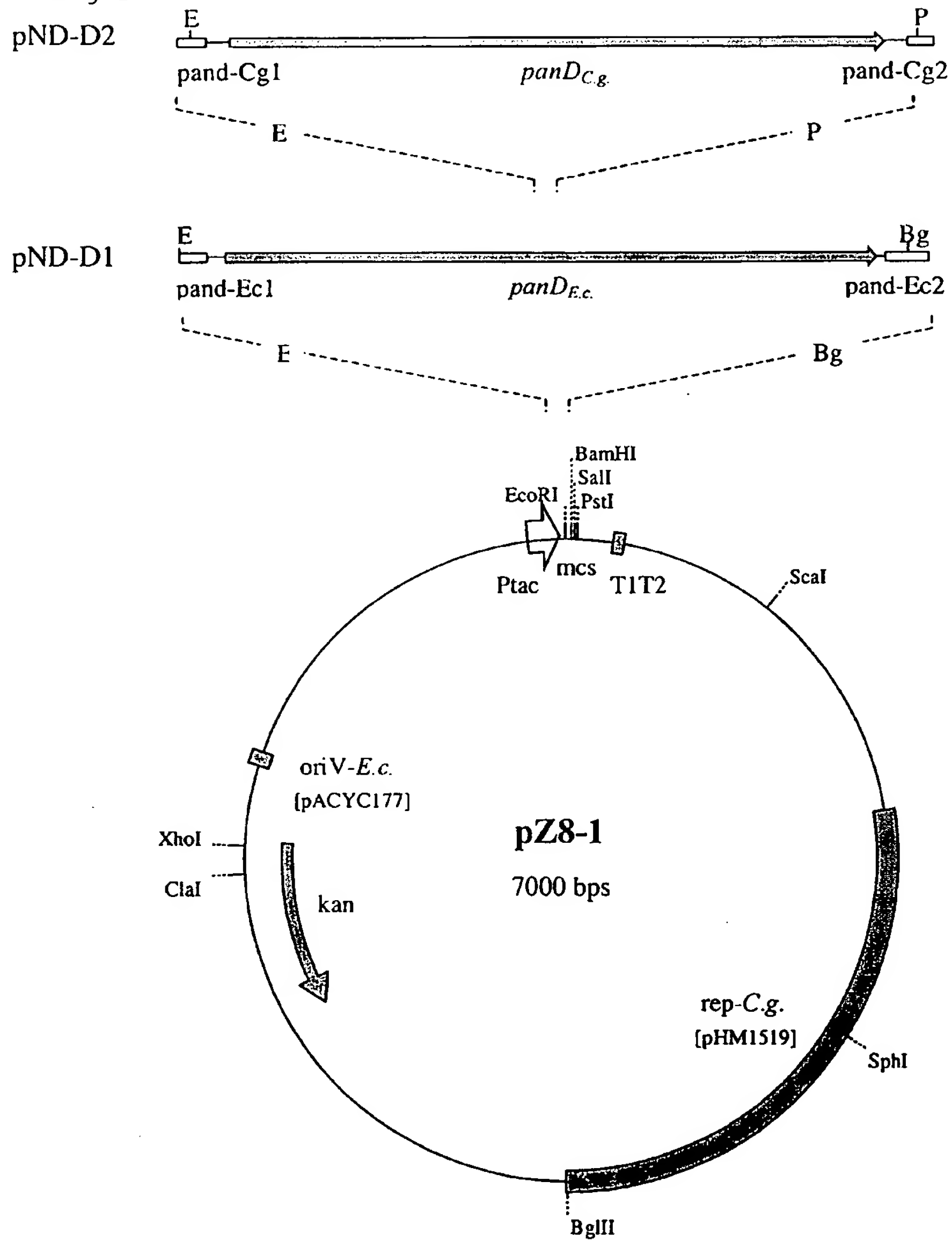


Abbildung 3

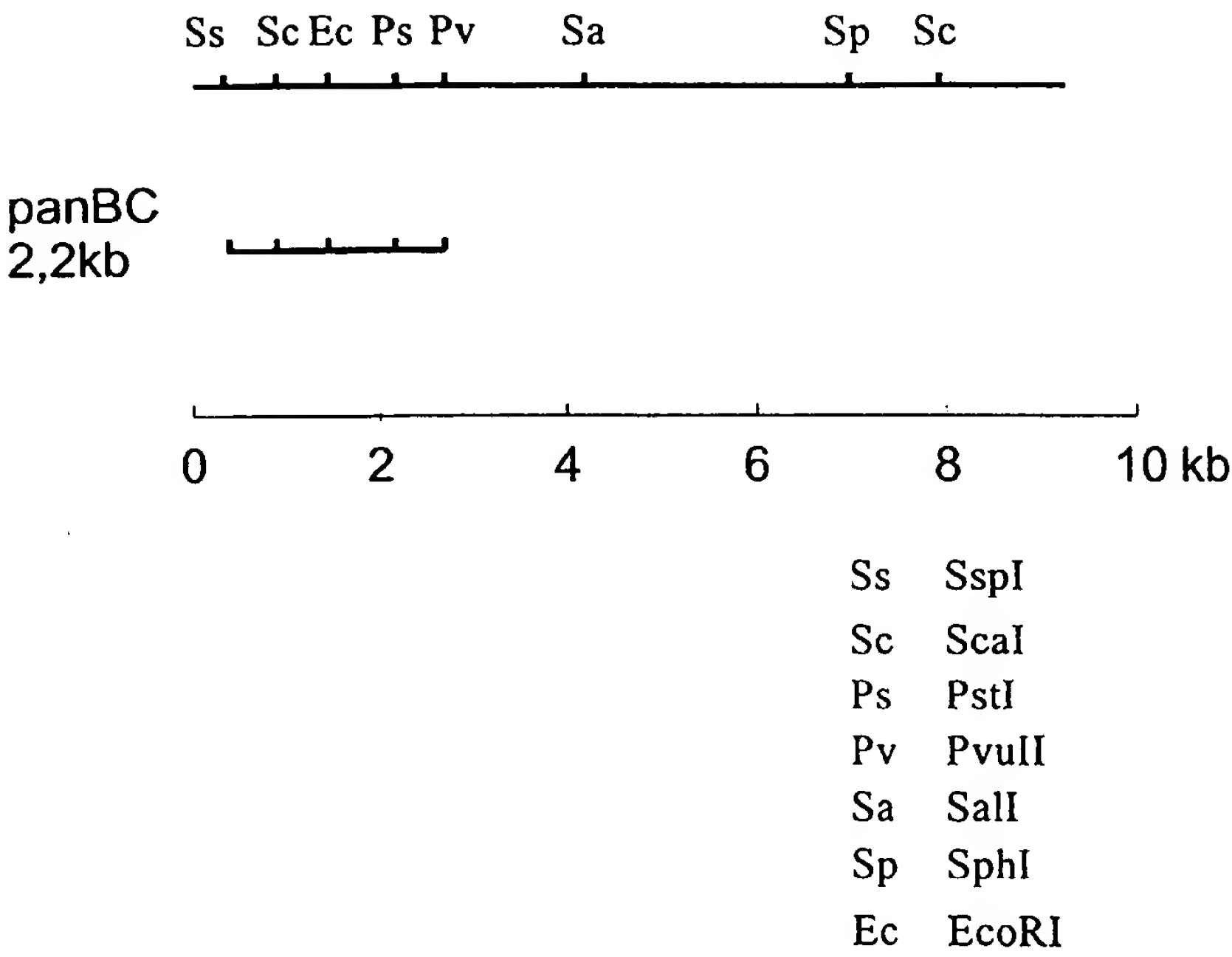


Abbildung 4:

